

OBTENCIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE UN CULTIVO DE LA MICROALGA
Chlorella vulgaris

RICARDO DAVID ANDRADE PIZARRO
ALFREDO CARLOS FERNANDEZ QUINTERO

UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍAS DE ALIMENTOS
SANTA MARTA
2003

OBTENCIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE UN CULTIVO DE LA MICROALGA
Chlorella vulgaris

RICARDO DAVID ANDRADE PIZARRO
ALFREDO CARLOS FERNANDEZ QUINTERO

Trabajo para optar al título de Especialista en Ciencias y Tecnologías de
Alimentos

DIRECTOR: PEDRO R. DUEÑAS RAMIREZ
B.M MSc

UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍAS DE ALIMENTOS
SANTA MARTA
2003

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Santa Marta, noviembre de 2003

Al YO SOY, mis hijas,
mis Padres y a mis
hermanos

Alfredo Carlos

A Dios, mis Padres,
mi Esposa, mi hija
Valentina y a mis
hermanos
Con todo mi amor.

Ricardo David

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Pedro R. Dueñas, Biólogo Marino, M Sc. Universidad de Hamburgo, Alemania, Docente de la Universidad de Córdoba, y Director del trabajo, por su valiosa asesoría y paciencia.

A Omar Pérez, Ingeniero Químico y Jefe del Programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Córdoba, por su colaboración en la realización de los análisis.

A Guillermo Arrazola, Ingeniero de Alimentos, Ph. D. Ciencias Químicas, Universidad de Alicante, por su colaboración en la realización de los análisis de Aminoácidos Esenciales.

A Rocío Acosta, Secretaria de la Universidad de Sucre, Justo Fuentes y Oscar Vergara, Docentes de la Universidad de Sucre, por su colaboración.

A las Universidades de Sucre y Córdoba, por la colaboración prestada.

A la Universidad del Magdalena, la que permitió ampliar nuestros conocimientos en el área de alimentos.

PTA
00001
p. 2

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	xiii
1. PROBLEMA	14
1.1. DESCRIPCION	14
1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GENERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. DELIMITACION	19
4.1. DELIMITACION CONCEPTUAL	19
4.2. DELIMITACION POBLACIONAL Y GEOGRAFICA	20
4.3. DELIMITACION TEMPORAL	20
5. ANTECEDENTES	21
6. MARCO DE REFERENCIA	25
6.1. MARCO TEORICO	25
6.2. MARCO CONCEPTUAL	32
6.3. HIPÓTESIS	33
6.4. VARIABLES	34
7. DISEÑO METODOLOGICO	35
7.1. POBLACIÓN Y MUESTRA	35
7.2. METODOLOGÍA	35

7.3. INSTRUMENTOS Y TÉCNICAS DE RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN	37
7.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	38
7.5. RECURSOS	39
7.5.1. RECURSOS HUMANOS	39
7.5.2. RECURSOS LOGISTICOS	39
8. RESULTADOS	40
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
10. CONCLUSIONES	54
11. RECOMENDACIONES	56
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	57
ANEXOS	60

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Contenido de aminoácidos esenciales de <u>Spirulina máxima</u> .	23
Tabla 2. Medidas de densidad óptica en tres cultivos de <u>Chlorella vulgaris</u> .	45
Tabla 3. Composición Bromatológica de la harina de <u>Chlorella vulgaris</u> .	46
Tabla 4. Composición aminoacídica de la proteína de <u>Chlorella vulgaris</u> (g/100 g proteína).	46
Tabla 5. Velocidad de crecimiento de los tres tipos de cultivo de <u>Chlorella vulgaris</u> .	50
Tabla 6. Determinación de Escor Químico (%)	52

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1. Relación entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo 1 vs Tiempo(Días).	47
Grafica 2. Relación Lineal entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo 1 vs Tiempo(Días).	48
Grafica 3. Relación entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo 2 vs Tiempo(Días).	48
Grafica 4. Relación lineal entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo 2 vs Tiempo(Días)	49
Grafica 5. Relación entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo 3 vs Tiempo(Días)	49
Grafica 6. Relación lineal entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo 3 vs Tiempo(Días)	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotografía <u>Chlorella vulgaris</u> .	36
Figura 2. Fotografía Cero día de Cultivo	40
Figura 3. Fotografía Un día de Cultivo	41
Figura 4. Fotografía Cuatro días de Cultivo	41
Figura 5. Fotografía Seis días de Cultivo	42
Figura 6. Fotografía Ocho días de Cultivo	42
Figura 7. Fotografía Diez días de Cultivo	43
Figura 8. Fotografía Doce días de Cultivo	43
Figura 9. Fotografía Catorce días de Cultivo	44
Figura 10. Fotografía Dieciocho días de Cultivo	44
Figura 11. Fotografía Veinte días de Cultivo	45

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Análisis de Aminoácidos Esenciales.	61
Anexo B. Análisis estadístico.	62

INTRODUCCION

La consecución de proteínas a partir de productos alimenticios de fácil accesibilidad, de bajo costo y de alto rendimiento ha llevado en los últimos años a plantear investigaciones en la búsqueda de este importante alimento a partir de organismos unicelulares.

En este trabajo se caracterizó bromatológicamente un organismo microscópico, *Chlorella vulgaris*, microalga de origen clorofilico, ampliamente distribuida en los cuerpos de agua. Ante los altos costos que representa la proteína utilizada en la elaboración de concentrados para animales, tal como la harina de pescado, dicha microalga se presenta como alternativa de alta calidad y fácil consecución.

Por lo tanto, la presente investigación podrá contribuir al desarrollo de nuevos proyectos que generen alternativas alimentarias.

1. EL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCION

La alimentación es un proceso vital, mediante el cual los seres vivos consumen sustancias que les proporcionan elementos para formar tejidos y/o energía(Horton, 1993).

La proteína es un compuesto orgánico fundamental en el crecimiento y desarrollo de los tejidos. Desde el punto de vista alimenticio, se encuentra en las carnes, los huevos y la leche, los cuales aportan concentraciones significativas de este alimento en la dieta humana. Sin embargo, no todos los asentamientos humanos tiene acceso a las proteínas requeridas para la adecuada supervivencia debido, entre otras causas a: superpoblación, limitaciones en la producción, su deficiente conservación, baja calidad y elevados costos; por lo cual se hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas a bajo costo de producción continua, fácil conservación y muy accesible.

Con base en investigaciones realizadas, se ha determinado que en algunas microalgas existen altos contenidos de proteína, en proporción al tamaño microscópico de la misma, y que debido a su gran proliferación y distribución geográfica ameritan que se formulen y desarrollen más investigaciones al respecto(De la Torre, 1985).

Mediante esta investigación aplicada, se intenta obtener proteína unicelular a partir de una microalga Clorophyta.

1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA

Se plantea el siguiente interrogante:

¿Es posible obtener proteína de alta calidad, a partir de cultivos de la microalga Chlorella vulgaris?

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Cultivar la microalga **Chlorella vulgaris** a nivel de laboratorio, convertirla en harina para determinar su calidad aminoacídica mediante la comparación por Escor Químico.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Elaborar un cepario de la microalga **Chlorella vulgaris** bajo condiciones optimas de cultivo.
- Determinar la cinética del crecimiento de la microalga.
- Elaborar harina a partir de la biomasa producida durante el cultivo de **Chlorella vulgaris**.
- Caracterizar bromatológicamente la harina de la microalga **Chlorella vulgaris**.
- Determinar el perfil de aminoácidos esenciales en la harina elaborada con la microalga **Chlorella vulgaris**.

3. JUSTIFICACIÓN

No obstante que la proteína, sustancia esencial en la dieta de los humanos, se obtiene de productos alimenticios como: carnes, huevos y leches, un gran porcentaje de la población mundial no tiene acceso a aquellos. Se observa, por ejemplo, que en Colombia, país al que sus condiciones geográficas y climáticas le adjudican características apropiadas para el desarrollo de la ganadería y la pesca (fuentes de proteínas) a gran escala, paradójicamente su población es considerada como subalimentada, con baja proporción en el consumo de proteína. Causas de esta paradoja se podrían circunscribir a problemas sociales, tecnológicos y económicos que hacen que estos productos sean costosos, o que al llegar a la mayoría de la población no sean consumidos con la calidad deseada.

La presente investigación se justifica en la necesidad de obtener proteínas, a partir de fuentes accesibles, de producción constante, de fácil conservación, de buena aceptación y, quizás, de bajo costo, no tradicional, como lo puede ser el organismo vegetal fotosintético, presente en la gran mayoría de los cuerpos de agua: la microalga *Chlorella vulgaris*.

Experiencias previas obtenidas en trabajos con este tipo de microorganismos, en la consecución de proteína, auguran una respuesta alimenticia contra la desnutrición a que se ven abocados los países tercermundistas (pobres y atrasados), los que en su gran mayoría poseen riqueza hidrográfica, fuente de microalgas (De la Torre, 1985).

La presente investigación plantea la elaboración de una harina a partir del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* factible de usarse como complemento proteínico.

4. DELIMITACION

4.1. DELIMITACION CONCEPTUAL

Las microalgas son organismos microscópicos clasificados como vegetales. Se caracterizan por habitar todos los cuerpos de agua donde existan las condiciones más simples para crecer. Son consideradas el primer escalón de la pirámide alimenticia, debido a que son autotróficas en su gran mayoría; es decir, que ellas, a partir del CO_2 y la luz, elaboran compuestos orgánicos (Abalde, 1995).

Se clasifican de acuerdo a la pigmentación predominante en ellas y, por lo tanto se encuentran las siguientes clases: *Clorophytas* (algas verdes), *Rhodophytas* (algas rojas), *Cyanophytas* (algas azules) y *Phaeophytas* (algas pardas), cada una de ellas con numerosas especies (Abalde, 1995).

Las microalgas representan una fuente proteínica con posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento de piensos animales, debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, potenciados por el hecho de poseer buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos, en comparación con otras fuentes de proteína unicelular (Kay, 1991).

La mayoría de las *Clorophytas* se caracterizan por ser organismos inmóviles, y se encuentran distribuidas en todos los cuerpos de agua donde puedan disponer de suficiente luz, y nutrientes simples, capaces de mantenerlas (Raymont, 1983). Dentro de la clase *Clorophytas*, se escogió *Chlorella vulgaris* con miras a cultivarla y analizarla, a partir de un cultivo "madre" desarrollado en la Universidad de Córdoba.

4.2. DELIMITACION POBLACIONAL Y GEOGRAFICA.

La microalga *Clorophyta* escogida para el presente estudio se encuentra distribuida geográficamente en todos los cuerpos de agua en donde se encuentren los requerimientos mínimos de luz y nutrientes. No obstante, para el presente estudio se obtuvieron muestras de cultivos provenientes del Centro de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba, CINPIC.

4.3. DELIMITACION TEMPORAL

La investigación tuvo una duración de doce meses, dividida en cuatro etapas: la primera considerada de aislamiento, se llevó a cabo en dos meses; la segunda, de producción y procesamiento, con duración de ocho meses; la tercera etapa, correspondió a los análisis en el laboratorio (Bromatológicos y Perfil de aminoácidos) con una duración de un mes, y la cuarta etapa, correspondió a la elaboración, análisis y realización del informe final(dos meses).

5. ANTECEDENTES

Las microalgas representan una fuente proteínica de posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento de piensos para animales, debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, caracterizados por poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular (Kay, 1991).

Aunque las investigaciones sobre la utilización de microalgas en la alimentación parece ser un tema relativamente reciente, en realidad su consumo por los habitantes de determinadas zonas data de tiempos inmemoriales (García, 1993). La obtención de proteína a partir del cultivo de microalgas data de los años 60; al parecer fueron los alemanes los primeros investigadores en obtener proteínas a partir de cultivos de organismos microscópicos de tipo vegetal, los cuales a mediados de los años 60, en la ciudad de Dortmund, con el afán de contribuir a la investigación de problemas alimenticios, estudiaron sobre las posibilidades proteicas de estos microorganismos. Bajo esta premisa desarrollaron investigaciones con el fin de obtener, primeramente, un concentrado para alimentar pollos y cerdos; y también su viabilidad como suplemento proteínico para consumo humano, estableciendo, además, el proceso de extracción de proteínas, a partir de su harina (Bezares, 1975).

En el año de 1971, mediante un convenio de cooperación técnica Peruano-Alemania, se inició un proyecto para estudiar la posibilidad de la producción masiva

de la microalga verde de agua dulce Scenedesmus acutus var. alternans, siguiendo la tecnología desarrolla en Dortmund. Ante los buenos resultados obtenidos, se construyó en 1978, en Sausal, cercana a la población de Trujillo(Perú), zona de excelentes condiciones ambientales y lumínicas, la primera planta de producción semi-industrial de microalgas con un método de cultivo basado en el original, pero con modificaciones notorias para adaptarlas a las condiciones de la costa Peruana (Castillo,1978).

En 1975, en la Universidad de Colima, México, se estudió el valor nutritivo del alga Spirulina gertleiri para dietas en pollos de engorde(Bezares, 1975). En esta misma Universidad, Mule en 1988, determinó el contenido proteico de *Cianofitas* (algas azules) de aguas residuales, con miras al aprovechamiento proteínico para alimentación (Mule,1988).

En países como México, Estados Unidos y Japón, Spirulina maxima es usada en la alimentación humana para suplir la deficiencia de proteína, obtenida con sistemas de producción, cosecha y secado muy tecnificados y costosos. Se han logrado producciones máximas de hasta 120 toneladas/ha/año, con promedio de proteína del 50%; y en sistemas de producción para nutrición de cerdos, se han obtenido entre 14 y 34 g Materia Seca / m² /día (Lincoln, 1985).

Los cultivos de microalgas se han empleado en la alimentación de animales, en humanos, en acuacultura para la cría de micro crustáceos, para tratamiento de aguas residuales y como fuente energética; además de contribuir a la eliminación de desechos (Pedraza, 1989).

Una de las microalgas más estudiada es Spirulina maxima, de la cual en la Florida existen plantas procesadoras que abastecen sistemas de cría de cerdos, basados en cultivos con efluente de biodigestores, y sistemas de biofloculación, capaces de lograr producciones de hasta 34 g Materia Seca/ m² /día, con 60% de

proteína(Lincoln, 1985). Igualmente se ha usado en la alimentación de pollos, proporcionando la suficiente proteína y favoreciendo la coloración del huevo(Castillo, 1978). Esta microalga presenta una alta porcentualidad proteica (entre 50 y 65) y un “pool” casi completo de aminoácidos esenciales para el ser humano; y según la FAO solo muestra limitación en el aminoácido azufrado (Kosaric, 1985). Véase Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de aminoácidos esenciales en *Spirulina máxima*

Aminoácidos Esenciales (AAE)	Medio sintético* (g/100 g de proteína)	Efluente** (g/1000 g de proteína)
L-Isoleucina	5.8	6.7
L-Leucina	9.3	9.2
L-Lisina	5.0	4.6
L-Fenilalanina+ L-Tirosina	4.0	4.4
L-Metionina+ L- Cistina	2.2	2.1
L-Treonina	4.9	5.3
L-Triptofano	nr	nr
L-Valina	6.9	6.6

nr: dato no registrado

* Medio Sintético: Cultivo Químico rico en Carbonato y Nitratos.

** Efluente: Desechos industriales o Aguas residuales.

Referencia: Kosaric, et al. 1985

Spirulina sp. cultivada también se utiliza para consumo humano, una vez libre de parásitos, desecada, transformada en harina y comercializada en forma de cápsulas (Shubert, 1985). Esta microalga es fuente importante de ácido gamma linoléico, muy importante su uso en la alimentación de hipertensos y pacientes con tensiones premenstruales, más económico que otro tipo de aceites (Roughan, 1989).

Estudios sobre la composición química y características del perfil aminoacídico de la microalga Chlorella cultivada en régimen autotrófico, han evidenciado que su biomasa proporciona elevados niveles de proteína bruta y verdadera (superior al 40 y 30 %, respectivamente), y acompañada de una composición balanceada y niveles aceptables de ácidos nucleicos, constituye una fuente alternativa de posible utilización como suplemento nutricional. La digestibilidad *in vitro* de la biomasa de Chlorella vulgaris tiene un valor promedio de 75,9 %, relativamente inferior al de la caseína (93,4 %) (Bermúdez, 1991).

La microalga Chlorella vulgaris posee propiedades hipocolesterolémicas; se ha demostrado que su relación Lys/Arg influye significativamente sobre el metabolismo del colesterol en ratas: una relación Lys/Arg igual a 1,0 se asocia a la disminución de niveles de colesterol en suero, hígado y aorta; y al incremento de la conversión oxidativa del colesterol en ácidos biliares, en comparación con el valor de 2,0; mientras menor sea esta relación, mayor será la reducción de la concentración de colesterol plasmático. La proteína de Chlorella vulgaris presenta una relación Lys/Arg igual a 0,97; condición que conjuntamente con otros factores podría explicar sus acciones moduladoras sobre el metabolismo del colesterol (Rajamohan, 1986).

6. MARCO DE REFERENCIA

6.1. MARCO TEORICO

Las condiciones de nutrición de una gran parte de la población humana son críticas(países tercermundistas), por lo cual es necesario formular investigaciones dirigidas a la producción de proteína a partir de alimentos no tradicionales, tal como la técnica de obtener proteínas a partir de cultivos de organismo presentes en la mayoría de los ambientes acuáticos, como las microalgas. Dentro de este tipo de microorganismos, son las *Clorofitas*, por ser fotosintéticas, las que proporcionan alto contenido de proteína, con un porcentaje de aminoácidos esenciales, comparable al de la carne del pescado(Kay, 1991).

Los requerimientos de proteína propuestos son aquellos considerados como necesarios para mantener la salud y las necesidades fisiológicas. La cantidad recomendada de proteínas con un coeficiente NPU(utilización proteína neta) igual a 75 corresponde en Inglaterra al 10% de la energía recomendada, teniendo en cuenta que las proteínas suministran 4 Kcal/g, en comparación con los lípidos que proporcionan 9 Kcal/g y los carbohidratos 4 Kcal/g(Robinson, 1991).

Sin embargo, las necesidades reales son de alfa-aminoácidos y, por lo tanto, la composición de aminoácidos esenciales de las proteínas en la dieta es extremadamente importante.

Se considera que la leche y el pescado son productos alimenticios que poseen en sus proteínas gran parte de estos aminoácidos y, por ende, son calificados, por la FAO (Organismo de las Naciones Unidas que vela por la alimentación y nutrición de la población mundial) como elementos necesarios para la dieta.

En primera instancia, la calidad de la proteína, en general, se determina por el número y contenido de aminoácidos esenciales que ella contenga. Dichos aminoácidos esenciales no son sintetizados, o si lo son, lo hacen en cantidades insuficientes para realizar los procesos metabólicos. Para el hombre son ocho: Leucina, Isoleucina, Valina, Treonina, Triptofano, Fenilalanina + Tirosina(AAA), Lisina, Cistina + Metionina(AAS). Sin embargo, dentro de estos aminoácidos esenciales sólo Lisina, AAS, Treonina y Triptofano, limitan la calidad de la proteína en la dieta humana. La Tirosina y la Cisteína se clasifican como aminoácidos esenciales puestos que no pueden ser sintetizados en cantidades adecuadas cuando la dieta es deficiente en Fenilalanina o Metionina, respectivamente (Robinson, 1991).

La utilización de proteína unicelular para suplir estas deficiencias, es un método que se ha venido implementando mediante cultivos, en los cuales el desarrollo depende de los requerimientos y exigencias de la calidad de éstos. Según su naturaleza, los cultivos se pueden clasificar de diversas maneras:

- a) Cultivos Intensivos: son aquellos en que los factores de crecimiento se mantienen completamente bajo control, de modo tal que se obtiene una máxima respuesta en la producción de la población.
- b) Cultivos Extensivos: son aquellos en que se controlan las variables mas accesibles en el manejo técnico, tales como las características químicas del medio y la densidad del cultivo, como reguladora de la luz.

Independientemente de estas dos clasificaciones, el método empleado en el cultivo según la forma de cosecharlo se clasifica en:

- a) Cultivos Continuos: en los cuales la población, las características químicas del medio, la temperatura y la luz, son sostenidas en un valor constante, por periodos prolongados, manteniendo un flujo constante de entrada de requerimientos y salida de productos.
- b) Cultivos Batch: en los cuales el cultivo se implementa de una vez y se cosecha completamente, luego que la población ha alcanzado un nivel apropiado de densidad. En estos generalmente la cosecha se realiza en la fase exponencial de crecimiento. Las cargas de nutrientes y luz, son proporcionadas al inicio del cultivo.
- c) Cultivos semicontinuos: en los cuales se combina los dos métodos reseñados anteriormente. En ellos, se cosecha una parte del medio según la producción y se renueva el volumen cosechado con medio de cultivo fresco.

Según la pureza del cultivo estos se clasifican en:

- a) Cultivos Axenicos: los cuales se mantienen libres de bacterias y por lo tanto requiere de un manejo cuidadoso, empleándose para ello material estéril.
- b) Cultivos monoespecificos: los cuales la población de microalgas se encuentra parcialmente contaminada con otros microorganismos, se emplea generalmente en cultivos tipo batch y extensivos.

En los cultivos de microalgas debe controlarse el crecimiento y los factores que lo afectan. Este depende básicamente del proceso fotosintético, que consiste en la

bioconversión de la energía radiante de la luz, en energía química, la cual se almacena en enlaces químicos de moléculas o estructuras orgánicas complejas. Este proceso se puede describir en tres etapas consecutivas:

- a) Captación de la energía luminosa, mediante los pigmentos fotosintéticos.
- b) Conversión de la energía radiante en energía química
- c) Asimilación de la molécula de CO_2 para la formación del primer producto de la fotosíntesis.

El crecimiento de una población de algas, responde a la interacción mutua de factores biológicos físicos y químicos, y se han identificado cinco fases de desarrollo:

- a) Fase de ajuste: En el cual no existe un incremento neto de la Población debido a la adaptación que sufren los organismos. Esto se produce cuando se realiza la inoculación inicial del cultivo a un medio fresco.
- b) Fase exponencial: Es la fase de crecimiento en la cual la biomasa se duplica sucesivamente en intervalos iguales de tiempo.
- c) Fase de retardo: En esta etapa el tiempo requerido para duplicar la población aumenta, reduciéndose así la tasa de crecimiento. Esto es consecuencia, tanto de la disminución de factores químicos de crecimiento, como de la reducción de la actividad fotosintética por incremento de la densidad poblacional, la cual disminuye la luz disponible por unidad de célula.
- d) Fase estacionaria: Etapa de corta duración, en la que no hay incremento neto de la población y la tasa de crecimiento se compensa con la tasa de mortalidad celular.

- e) Fase de muerte: Es la fase final de desarrollo de la población, la tasa de mortalidad supera la tasa de generación de células.

Entre los factores que afectan el crecimiento de las microalgas en los cultivos están:

1) Factores físicos:

a) Efecto sobre la luz sobre el crecimiento: A bajas intensidades luminosas, la tasa de producción fotosintética se incrementa proporcionalmente con la intensidad de la luz, a intensidades mas altas la producción fotosintética sufre un retardo hasta alcanzar un nivel de saturación o de máxima tasa de producción. Con aumentos posteriores a este valor, la producción fotosintética disminuye debido a un efecto de inhibición en la producción y foto-oxidación de los pigmentos. Así, a intensidades de luz muy elevadas, la foto-oxidación del sistema enzimático y de la clorofila, produce una inhibición permanente de la fotosíntesis. La calidad espectral de la luz, es un factor importante en las microalgas, ya que solo pueden emplear en la fotosíntesis, longitudes de ondas comprendidas entre 300-700nm, entre estos valores el espectro fotosintéticamente activo, es captado por los pigmentos principales (clorofila) y secundarios (carotenos). Estos últimos, tienen gran importancia en la captación de fotones que no excitan la clorofila, aumentando así, la eficiencia fotosintética de la célula(Uribe, 1995).

La intensidad de la luz en cultivos artificiales, varia entre 2000 – 5000 lux, según el estado y densidad de la población. Esta, normalmente es aportada por tubos fluorescentes. Para aumentar la eficiencia fotosintética, esta debe ser agitada frecuentemente con aire para aumentar la exposición a la luz.

b) Efecto de la temperatura sobre el crecimiento: En el ambiente natural, la producción fotosintética ocurre en un amplio de temperaturas, en regiones polares a -2°C a mayores de 30°C en regiones tropicales. En condiciones de saturación de luz, un incremento de la temperatura, produce un incremento en la tasa de producción fotosintética, elevándose así el nivel de saturación de la fotosíntesis. En general un aumento en la temperatura induce una activación de la fotosíntesis cuando este proceso no se encuentra limitado por otros factores como la luz y el sustrato químico. Esto se debe a que la temperatura tiene su principal efecto en los procesos enzimáticos, mientras que no afectan el proceso fotoquímico propiamente tal.

2) Factores químicos

Nutrientes: Los sustratos químicos del medio, son asimilados de acuerdo con la velocidad de reacción de la enzima específica que participa en el proceso de transporte y síntesis, desde el medio nutritivo hasta el interior de la célula. Como la concentración de un nutriente, afecta la tasa de producción fotosintética, la tasa de división celular y composición celular, el crecimiento de una población se hace dependiente no solo de los factores físicos ya señalados, sino que además de la presencia de los compuestos químicos orgánicos e inorgánicos, tanto a nivel traza como de macro elementos.

Para el crecimiento saludable, las microalgas requieren un abastecimiento importante de nitrógeno y fósforo, caso de las de aguas dulces. Estos elementos participan directamente en la formación de proteínas, ácidos nucleicos y ATP. El nitrógeno puede ser empleado como nitrógeno molecular (algunas algas azul-verde), amonio nitrito y nitratos. Cuando la concentración de nitrógeno se reduce por bajo un determinado valor, este afecta la fotosíntesis.

En condiciones limitantes de nitrógeno, los procesos enzimáticos son mas lentos que el proceso de fotosíntesis en su primera fase (proceso fotoquímico), lo cual se hace mas notable en condiciones de alta intensidad luminosa. Ree y Gotham han demostrado que existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento y la cantidad de nitrógeno celular, a intensidades luminosas, en las que, bajo condiciones limitadas es la deficiencia de nitrógeno en la célula, lo que reduce la tasa de crecimiento.

El fósforo inorgánico, como fosfato, es empleado completamente por las microalgas. El tamaño de las células puede verse afectado por la disponibilidad de nutrientes; aquellas especies que se han adaptado a vivir en condiciones de bajas concentraciones, son generalmente mas pequeñas, que aquellas que necesitan altas concentraciones de nutrientes.

Los microelementos y elementos trazas tienen una importante participación en el crecimiento celular. El hierro, manganeso y cobre participan en la formación de ferredoxinas, cofactores enzimáticos y ciclos de oxido reducción respectivamente. Algunos elementos, como el molibdeno, Vanadio y cobalto, son esenciales para las algas, ellos son requeridos en pequeñas cantidades y su tolerancia es limitada (Uribe, 1995).

6.2. MARCO CONCEPTUAL

GLOSARIO

ABSORBANCIA: La absorbancia es un medio espectrofotométrico, es proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe la luz monocromática incidente.

ALFA-AMINOACIDOS: Ácido carboxílico que contiene un grupo amino en su carbono 2, conocido también como carbono alfa.

L-AMINOÁCIDOS ESENCIALES: Aminoácidos que no son sintetizados por el organismo; o si lo son, no se sintetizan en las cantidades requeridas, por lo que deben ser incorporados a través de la alimentación.

ANALISIS PROXIMAL DE WEENDE: Conjunto de determinaciones que describen la composición proximal de una sustancia alimenticia.

BROMATOLOGIA: Rama de la fisiología que se ocupa de las necesidades alimenticias (cualitativas y cuantitativas) del organismo en diversas condiciones, así como el contenido alimenticios(plástico, energético y catalítico)de las sustancias nutritivas.

Chlorella: microalga eucariótica que vive en aguas dulces, del tamaño de un eritrocito humano (2-8 micrones de diámetro). Pertenece al genero de las *clorofitas* o algas verdes.

ESCOR QUÍMICO: Método mas común de estimación de la calidad de la proteína, en el cual cada uno de los aminoácidos esenciales de la proteína se compara con los correspondientes de una proteína estándar o patrón de referencia proteínico.

MICROALGA: Organismo microscópico perteneciente al reino de los procariotes, considerada por muchos como vegetal. Geográficamente distribuida en ambientes húmedos tanto lénticos como lóticos. Base de la cadena alimenticia por ser, en su gran mayoría, autotróficos.

PROTEINA: Compuesto químico vital en la alimentación de organismos vivos, ya que incide en la formación de tejidos y en el crecimiento. Se halla compuesta de unidades fundamentales llamadas aminoácidos.

RECOMENDACIONES PROTEICAS: Niveles de proteínas propuestos como necesarios para mantener la salud y las necesidades fisiológicas de la mayor parte de los individuos de un grupo de población.

6.3. HIPOTESIS

a) Hipótesis Nula, H_0 :

La harina elaborada a partir de la microalga *Clorophyta Chlorella vulgaris*, posee alto nivel de proteína cuyo perfil de aminoácidos esenciales es promisorio para consumo humano y/o animal..

b) Hipótesis Alternativa, H_a :

La harina elaborada a partir de la microalga *Clorophyta Chlorella vulgaris*, no posee alto nivel de proteína y no presenta un perfil de aminoácidos esenciales promisorio para consumo humano y/o animal.

6.4. VARIABLES

Las variables representativas de esta investigación son:

Variables Independientes:

- ❖ La microalga *Clorophyta Chlorella vulgaris*.
- ❖ Concentración de medio de cultivo.
- ❖ Tiempo

Variables dependientes:

- ❖ Densidad óptica del cultivo.
- ❖ Contenido de proteína.
- ❖ Contenido de aminoácidos esenciales.

7. DISEÑO METODOLOGICO

7.1. POBLACION Y MUESTRA

El desarrollo de la investigación correspondió a las de tipos de campo y experimental, en los cuales la información registrada fue de carácter primario, ya que fueron controladas las condiciones de producción. Fue una investigación netamente aplicada para logros prácticos.

7.2 METODOLOGIA

Se obtuvo una muestra impura de *Chorella vulgaris* en el Centro de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba, purificada posteriormente mediante diluciones continuas(Figura 1). Luego se realizó un cultivo tipo batch, de pureza monoespecífica y extensiva, colocando una gota de la muestra en un tubo ensayo que contenía 10 mL de agua destilada con el medio de cultivo Triple 15, incubando a la acción de la luz directa durante 48 horas. A continuación se transfirió un mL del inóculo anterior a tres erlenmeyer de cinco litros, que contenían tres litros de agua destilada con el medio de cultivo(Triple 15). Fueron evaluados tres tipos de concentraciones de medio de cultivo, a saber:

Tipo Uno: 1 mL de medio de cultivo / 1 L de agua destilada.

Tipo Dos: 3 mL de medio de cultivo / 1 L de agua destilada.

Tipo Tres: 5 mL de medio de cultivo/ 1 L de Agua destilada.

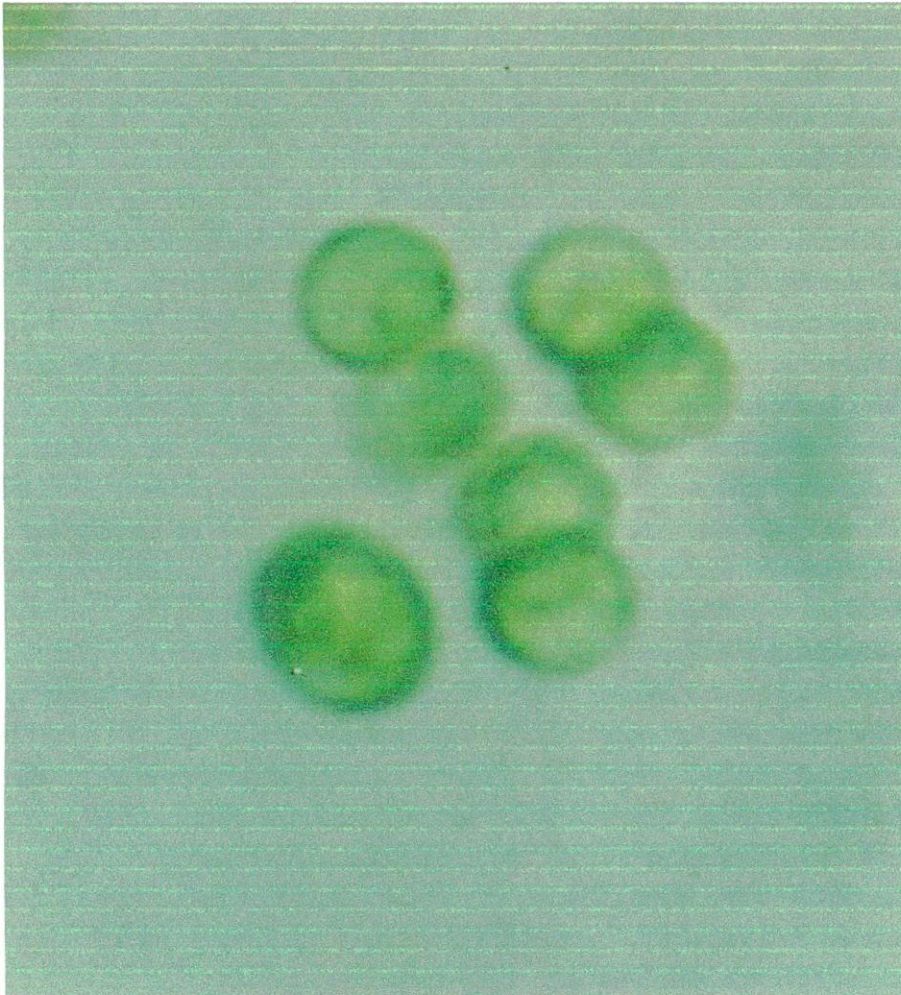


Figura 1. Fotografía Chlorella vulgaris

El medio de cultivo fue preparado de la siguiente forma:

Se pesaron 10 gramos de Triple 15 comercial y fueron diluidos en 100 mL de agua destilada.

Los cultivos inoculados en los erlenmeyer se mantuvieron durante 20 días iluminados con luz artificial y con corriente continua de aire. Cada dos días se tomaron muestras de 5 mL de cada recipiente para medir en un espectrofotómetro Merck SQ 118, la absorbancia a 585 nm y establecer la densidad del cultivo (Scragg, 1999).

De los tres tipos de concentración de medio de cultivo ensayado, se seleccionó el que reportó la mayor densidad óptica, con el fin de elaborar la harina, para lo cual su contenido fue centrifugado a los 20 días y la pasta húmeda obtenida se transfirió a un mortero de porcelana colocado en estufa a 40°C, durante 18 horas. La pasta seca se maceró hasta obtener la harina, consistente en un polvo verde característico.

A la harina se le realizaron exámenes bromatológicos y un perfil de aminoácidos esenciales con el fin de determinar el escor químico de la proteína.

A las muestras de la biomasa se le determinaron: Humedad, Proteína Bruta (micro-Kjeldahl, empleando 6,25 como factor de conversión para la estimación del contenido proteico), Fibra cruda, Lípidos y Cenizas (Laboratorio de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Córdoba, Colombia, sede Berastegui), según la metodología recomendada por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984) y los aminoácidos esenciales se determinaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Universidad de Alicante, España (Ver Anexo A).

7.3. INSTRUMENTOS Y TECNICAS DE RECOLECCION DE LA INFORMACION

La información fue registrada en un formato que tuvo en cuenta las condiciones experimentales siguientes:

- Concentración de cultivo(mL de medio de cultivo/ 1 L de Agua destilada)
- Densidad óptica(Absorbancia).
- Tiempo(Hora y Día)
- Características de cultivo.

Los registros se consignaron en hojas tabuladas de acuerdo a lo expuesto, para cada concentración.

Los registros fueron comparados con los resultados obtenidos en otras investigaciones y discutidos para la comprobación o rechazo de las hipótesis.

La obtención y análisis de la harina se fundamentó en los procesos de obtención de concentrados a nivel industrial, pero adaptado a las condiciones del laboratorio y características de la microalga, la cual debe ser cultivada y mantenida en foto incubadoras con el fin de garantizar su proliferación.

7.4. TECNICAS DE ANALISIS DE LA INFORMACION

La información se analizó tabulando los datos obtenidos en cada experiencia, mediante la construcción de la curva \ln Absorbancia vs Tiempo(días); para cada una de las concentraciones de medio de cultivo utilizadas con posterioridad, se seleccionó el medio de cultivo que presentó mayor velocidad de crecimiento.

Para determinar la mejor concentración de los tipos de cultivos estudiados, se confrontaron las relaciones absorbancia vs tiempo, mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial, determinando su significancia por el análisis de Varianza(ANAVA); cuando se estableció diferencia significativa entre la

interacción de los factores, se realizó un Test de Rango Múltiple de Duncan, determinándose el mejor tratamiento, para lo cual se utilizó el Programa MSTAT (Ver Anexo B)

7.5. RECURSOS

7.5.1. Recursos humanos.

El desarrollo de este trabajo estuvo a cargo de un Biólogo Marino, un Ingeniero Químico y un Ingeniero Pesquero, y el apoyo de un asistente de laboratorio.

7.5.2. Recursos logísticos.

- Laboratorio de Microbiología: Microscopios, agujas de aislamiento, medio de cultivo, material de vidriería, foto incubadora, compresor y Espectrofotómetro U.V Merck SQ 118.
- Laboratorio de Bromatología: Material de vidriería, Equipo Kjeldalh, Equipo de Soxhlet, muflas y reactivos químicos.
- Laboratorio de Procesos: Centrífuga, Secador y Triturador.
- Laboratorio de Informática: Computador.

8. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta investigación se presentan en las Tablas donde aparecen: densidad óptica para los diferentes tipos de medio de cultivo (Tabla 2); Análisis Proximal de la harina (Tabla 3) y Perfil Aminoacídico de la Proteína del microalga obtenida(Tabla 4). También se muestra una serie de fotografías para observar mejor el seguimiento realizado durante el crecimiento del cultivo (Ver Figuras 2 al 11).

El rendimiento alcanzado de la harina producida estableció un promedio de 444 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cultivo(Se obtuvieron 1.332 gramos de harina en 3 litros de cultivo).



Figura 2. Fotografía Cero días de Cultivo.

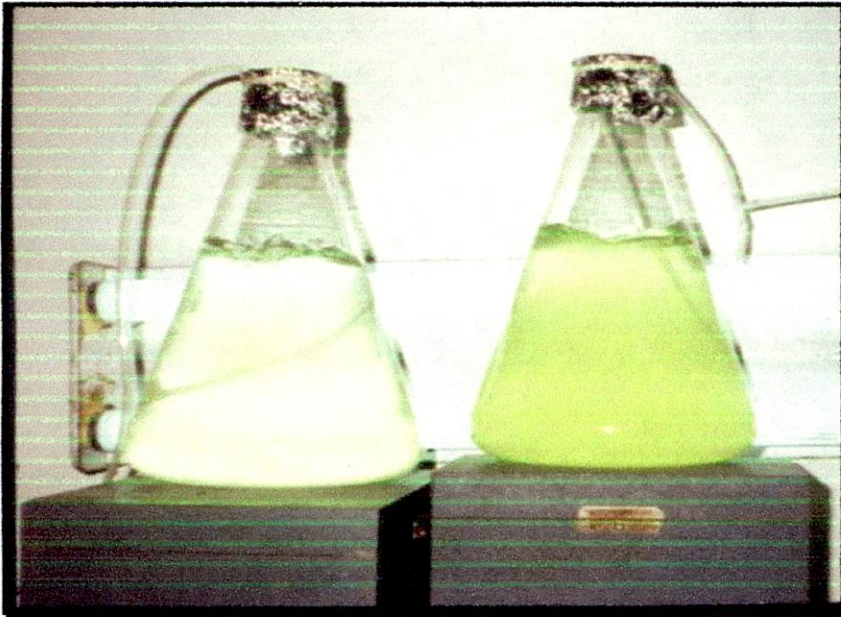


Figura 3. Fotografía Un día de Cultivo.

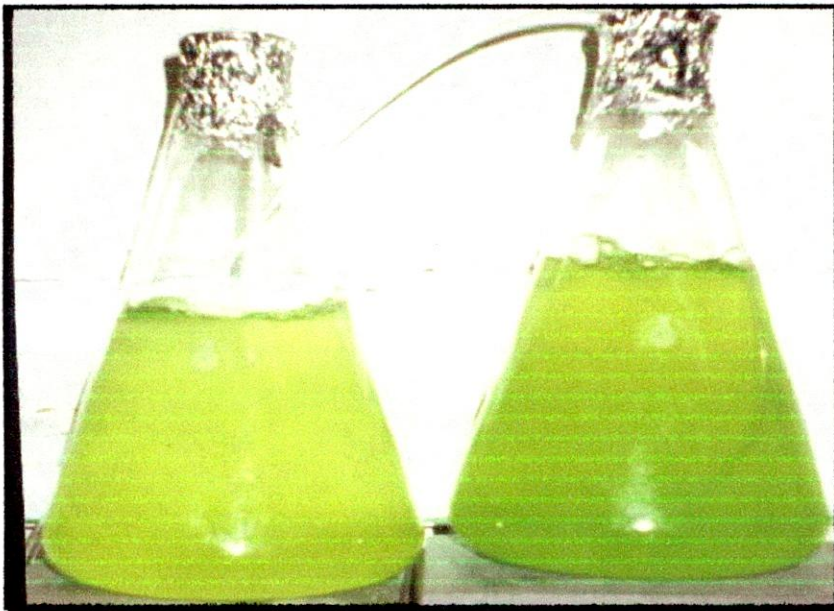


Figura 4. Fotografía Cuatro días de Cultivo.

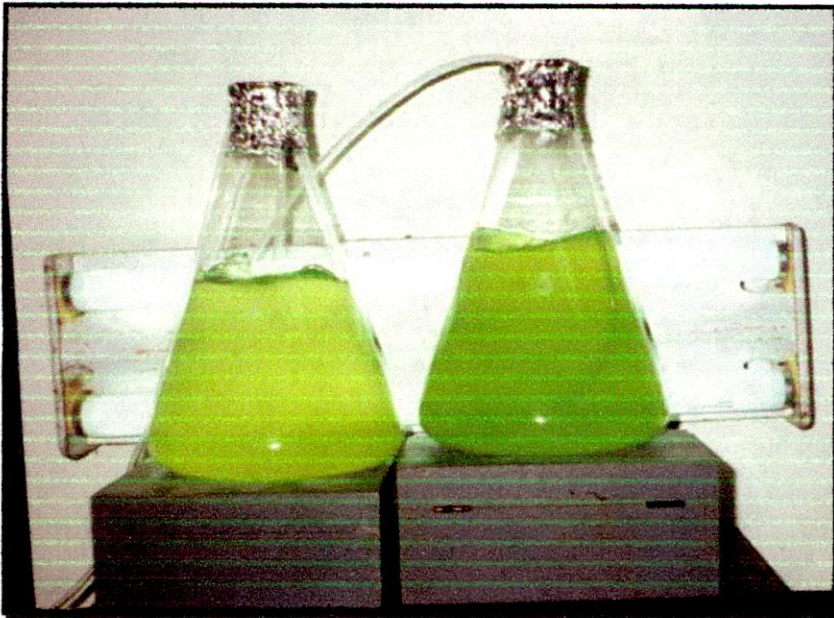


Figura 5. Fotografía Seis días de Cultivo.

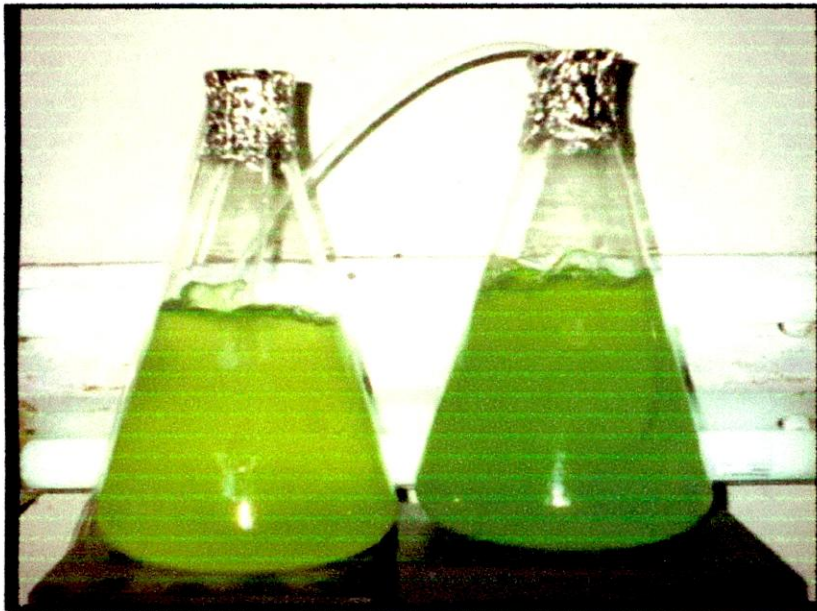


Figura 6. Fotografía Ocho días de Cultivo

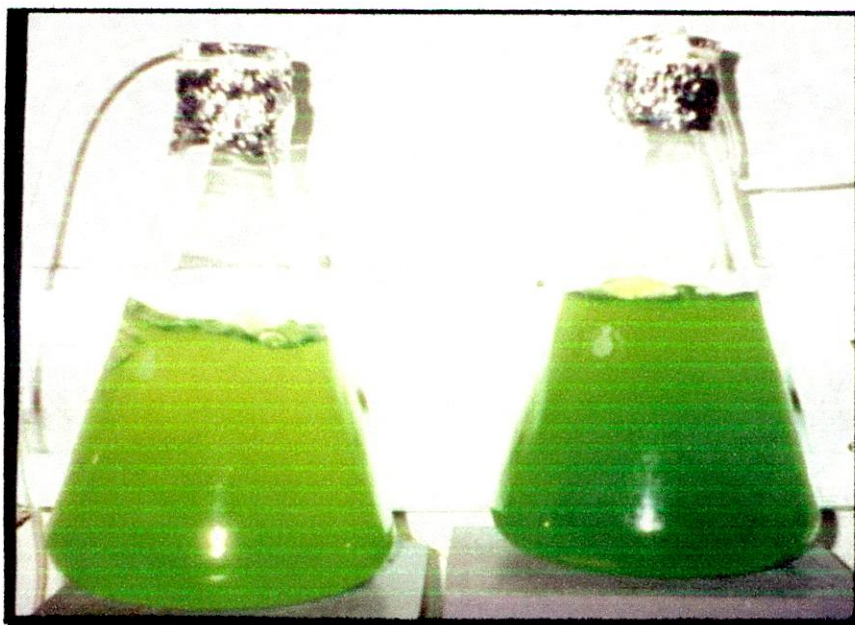


Figura 7. Fotografía Diez días de Cultivo.

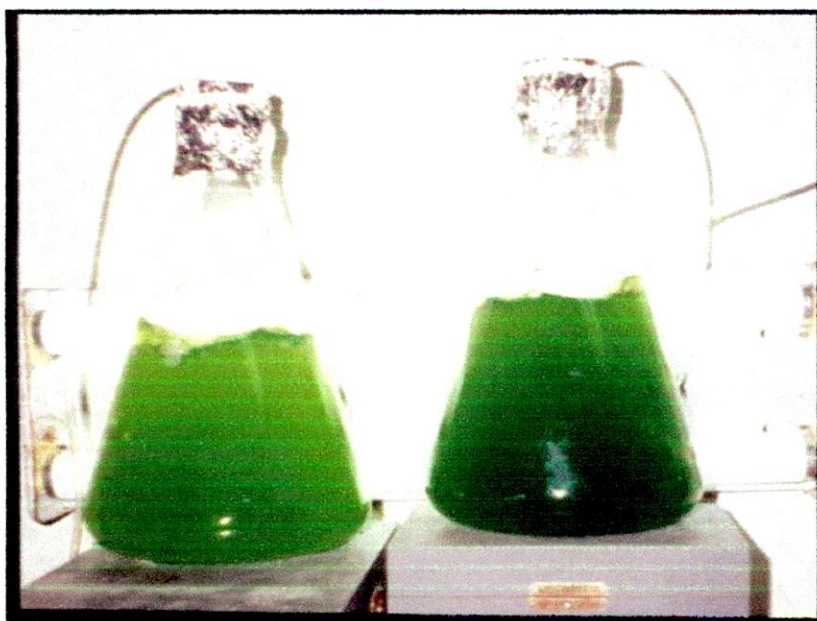


Figura 8. Fotografía Doce días de Cultivo.

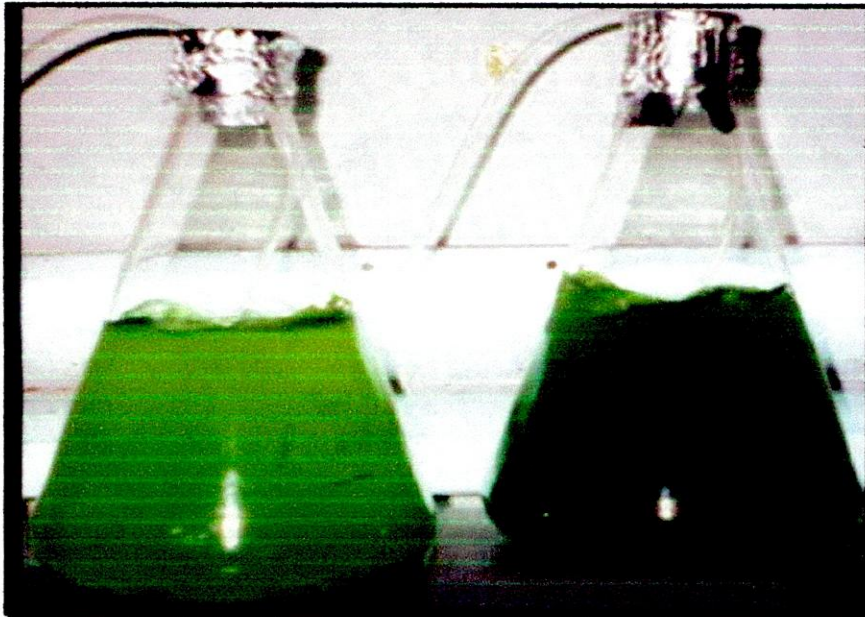


Figura 9. Fotografía Catorce días de Cultivo.



Figura 10. Fotografía Dieciocho días de Cultivo

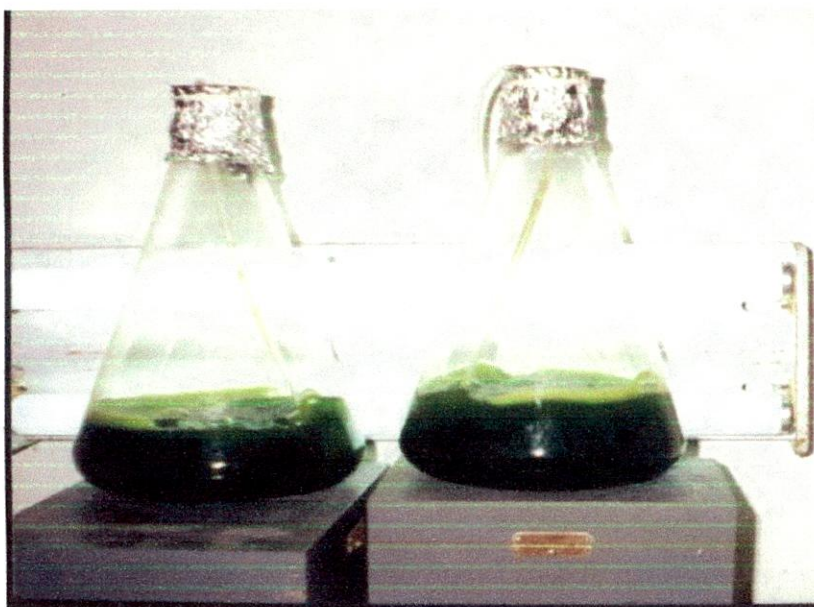


Figura 11. Fotografía Veinte días de Cultivo.

Tabla 2. Medidas de densidad óptica en tres cultivos de *Chlorella vulgaris*.

Tiempo (Días)	Cultivo Tipo Uno (1 ml/L)	Cultivo Tipo Dos (3 ml/L)	Cultivo Tipo tres (5 ml/L)
	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
0	0.098	0.170	0.246
2	0.202	0.280	0.326
4	0.363	0.449	0.422
6	0.640	0.485	0.572
8	0.878	0.672	0.688
10	1.191	0.875	0.746
12	1.449	1.124	0.821
14	1.620	1.242	0.948
16	1.721	1.326	1.084
18	1.804	1.376	1.162
20	1.860	1.448	1.220

Tabla 3. Composición Bromatológica de la harina de *Chlorella vulgaris*.

Componente	Contenido (g/100g)
Humedad	7.05
Proteína Bruta	56.25
Grasas	5,25
Cenizas	9.80
Carbohidratos	17,10
Fibra cruda	4.60

Tabla 4. Composición aminoacídica de diversas proteínas de origen animal y vegetal, en comparación al Patrón FSAO-OMS (1985).

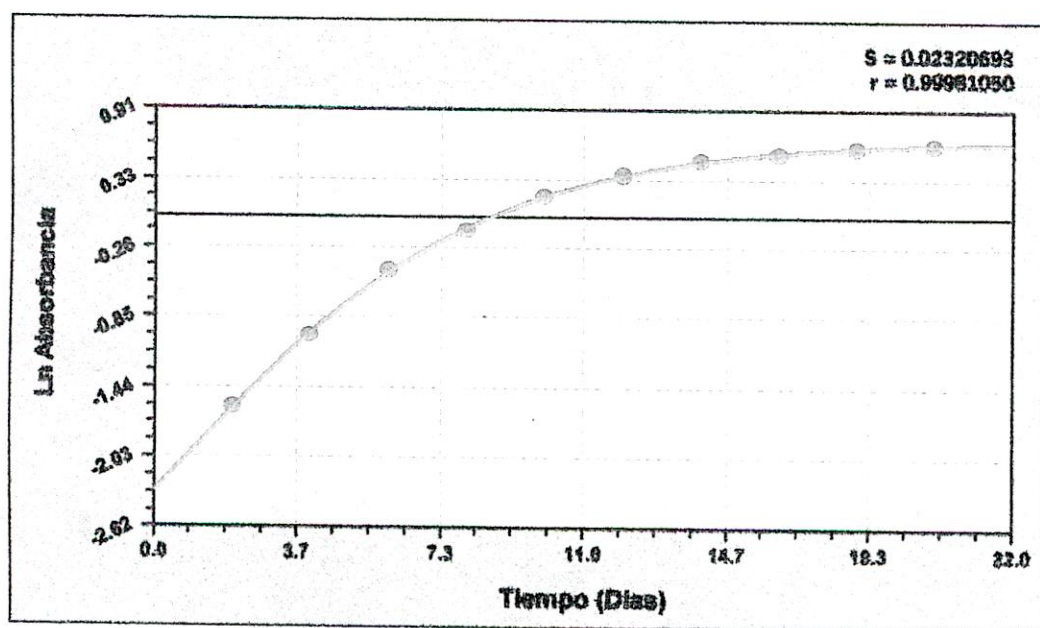
Aminoácidos Esenciales (AAE)	Contenido AAE(g/100g Proteína)					
	Proteína de <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i>	Proteína de <i>Scenedesmus</i> <i>sp.</i>	Proteína de Maíz	Proteína de Leche (Vaca)	Proteína de Huevo (Gallina)	Patrón FAO- OMS(1985)
L-Isoleucina	4,82	3.80	3.68	4.72	6.29	2.80
L-Leucina	10,78	8.40	12.53	9.54	8.84	6.60
L-Lisina	7,70	5.70	2.67	7.79	6.98	5.80
AAS(L- Metionina+L- Cisteina)	2.35	2.30	3.47	3.33	5.79	2.50
AAA (L-Fenil- alanina + L- Tirosina)	9.04	5.10	8.70	10.13	8.99	6.30
L-Treonina	5,60	5.10	3.60	4.45	5.12	3.40
L-Triptofano	1,12	1.50	0.70	1.41	1.49	1.10
L-Valina	n.r	5.70	4.85	5.79	6.85	3.50

n.r no reportado. Fuente: Robinson, D. 1991

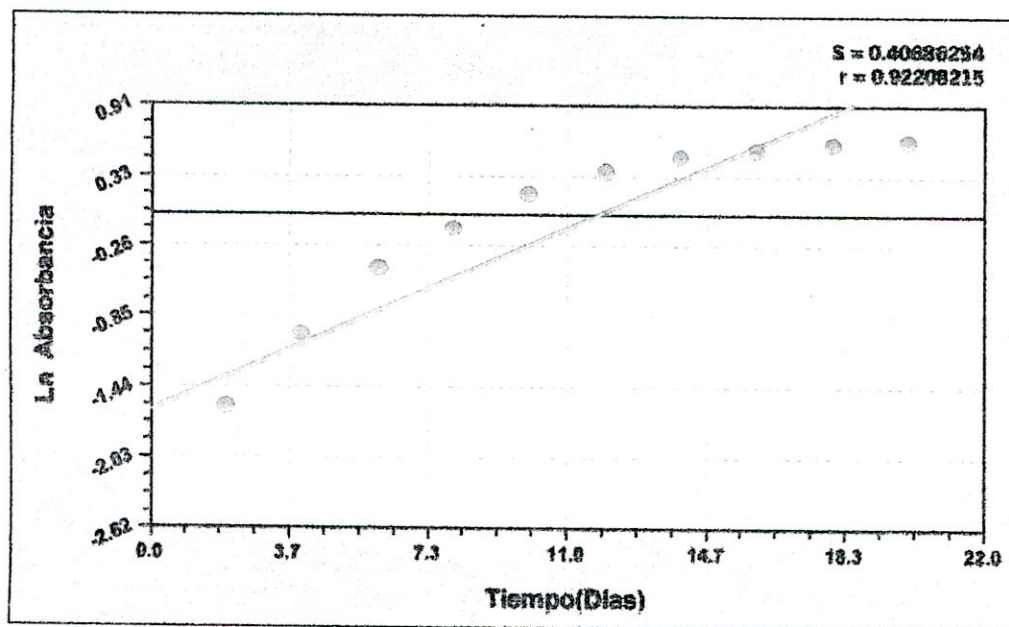
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para explicar mejor el comportamiento de la densidad óptica en función del tiempo, en las tres concentraciones estudiadas de medio de cultivo, los valores presentados en la Tabla 2 fueron graficados (Programa Curve Expert 3.1), considerando como variable independiente el tiempo (días) y como variable dependiente el \ln absorbancia, para cada una de las concentraciones consideradas (Ver graficas 1-6).

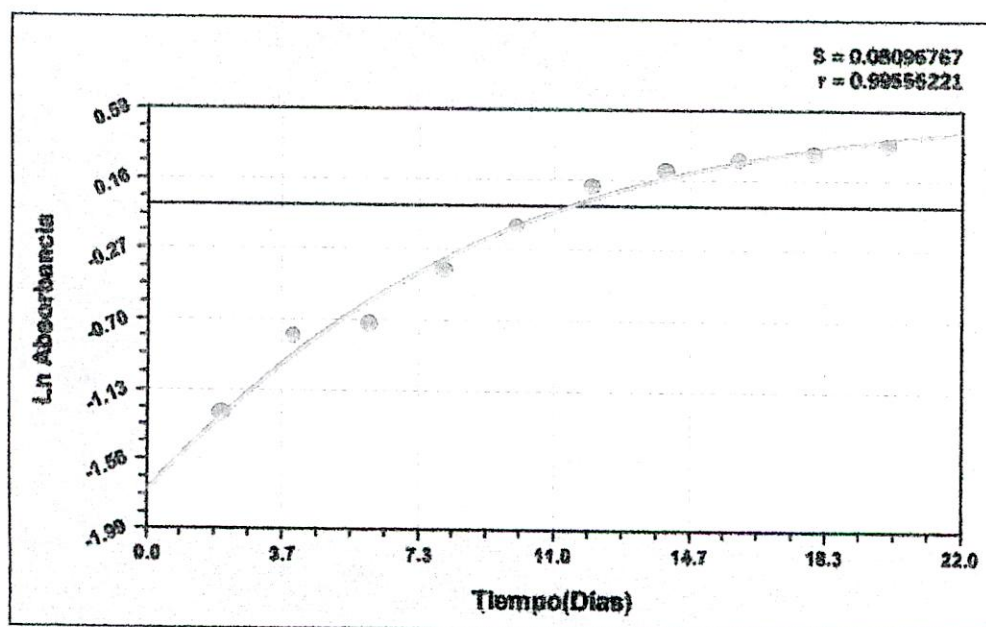
Grafica 1. Relación entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo Uno vs Tiempo (Días).



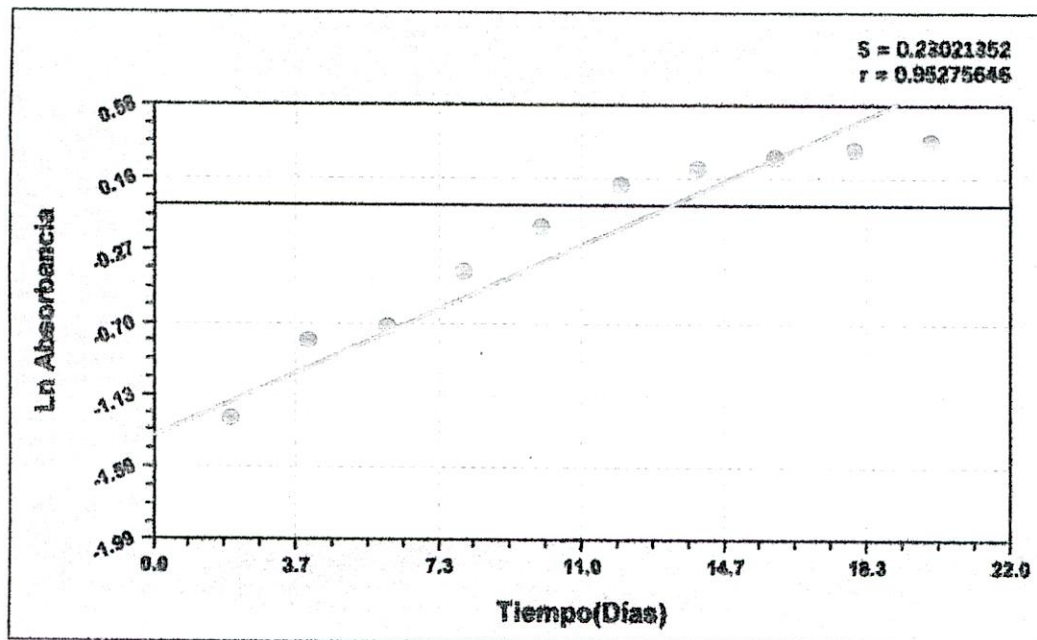
Grafica 2. Relación Lineal entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo Uno vs Tiempo(Días).



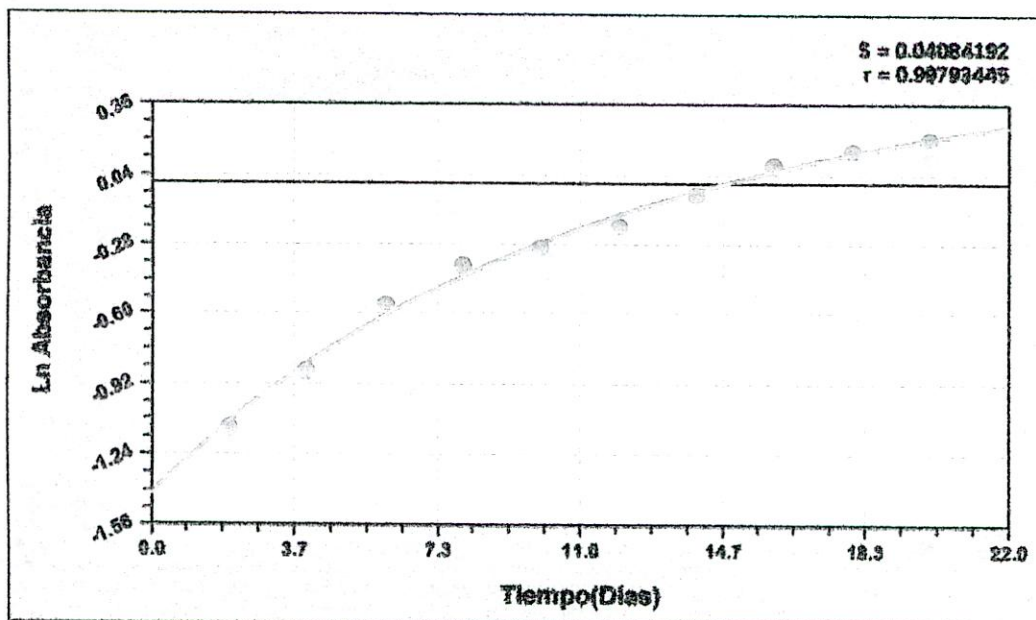
Grafica 3. Relación entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo Dos vs Tiempo(Días).



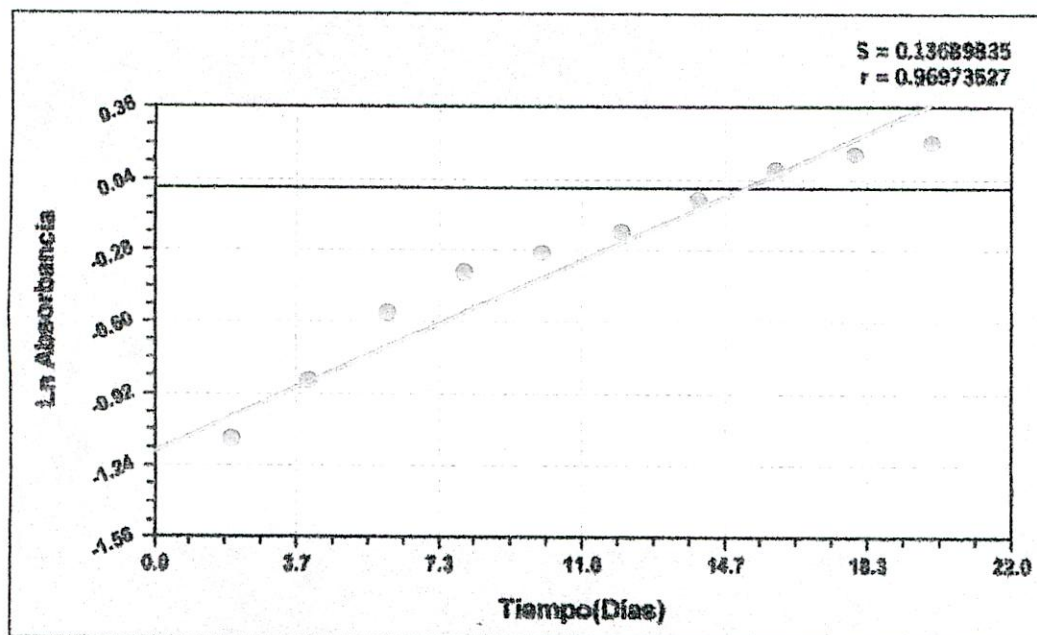
Grafica 4. Relación lineal entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo Dos vs Tiempo(Días)



Grafica 5. Relación entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo Tres vs Tiempo(Días)



Grafica 6. Relación lineal entre Densidad Óptica del Medio de Cultivo Tipo Tres vs Tiempo(Días)



Para los tres tipos de cultivo la ecuación que mejor representa la relación entre ln absorbancia vs Tiempo, es una función racional de la forma $Y=(a+bX)/(1+cX+dX^2)$; graficas 1,3,5, aplicando regresión lineal(graficas 2,4,6) para determinar cuál de los tres cultivos presentaba mayor velocidad de crecimiento, correspondiendo la mejor producción de biomasa a la concentración igual a 1 ml del medio de cultivo por litro de agua destilada; constatado mediante la Prueba de Duncan(Anexo B).

Tabla 5. Velocidad de crecimiento de los tres tipos de cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Tipo de Cultivo	Ecuación Lineal	Pendiente(Velocidad de crecimiento)
1	$Y = -1,6347 + 0,1386 X$	0,1386
2	$Y = -1,3780 + 0,1033 X$	0,1033
3	$Y = -1,1806 + 0,0777 X$	0,0777
Y =ln Absorbancia		X = Tiempo(días)

Se observa que para las tres concentraciones de medio de cultivo consideradas, el tiempo óptimo de producción correspondió a 15 días; registrado en el punto donde termina la fase de crecimiento exponencial y se inicia la fase estacionaria. Este tiempo concuerda con los resultados reportados por Uribe(Uribe, 1995).

Las concentraciones de proteínas bruta de 56.25 % encontradas revelan valores relativamente altos en comparación con otras fuentes proteínicas reconocidas.

Los carbohidratos suelen formar parte del material de reserva y desempeñan una importante función en la digestibilidad de la biomasa total de microalgas, el nivel determinado correspondió a una porcentualidad igual a 17,1.

Las cenizas representaron una fracción considerable del peso seco(10.54%), comparable con los valores informados para otras especies dulceacuícolas y por debajo de otras especies tales como Spirulina maxima(Shubert, 1985).

El nivel aminoacídico de Chlorella vulgaris comparados con el del Patrón de referencia de AAE(FAO-OMS/1985) con microalgas como Scenedesmus sp. y productos alimenticios comunes(leche, huevo y maíz) , mostró que su proteína tiene como Primer Limitante a AAS(94.0%): Es decir la proteína de Chlorella vulgaris tiene un déficit de AAS igual a : $100\% - 94\% = 6.0\%$ (que como, se observa no es muy critico).

Además, surge un problema para determinar la calidad de la proteína porque no se pudo determinar el contenido de L-Valina en la proteína de Chlorella vulgaris

No obstante, la proteína de la microalga Chlorella vulgaris presenta mejor calidad que la de la microalga Scenedesmus sp. Ésta en su proteína tiene Primer Limitante a AAA(91.07%); como Segundo Limitante a AAS(92.0%) y como Tercer

Limitante a L-Lisina(98.28%), cuyos respectivos déficit relativos en comparación al Patrón FAO-OMS(1985) son realmente muy bajos, o sea, no muy críticos.

Aparentemente la proteína de Chlorella vulgaris presenta mejor perfil de AAE que la proteína del Maíz, ya que esta tiene como Primer Limitante a L-Lisina(46.03%), y como Segundo Limitante L-Triptofano(63.64%), con déficit relativos iguales a 63.97% y 36.36%, respectivamente, en verdad muy críticos(Tabla 6)

Tabla 6. Determinación de Escor Químico (%)

L-Aminoácidos	Proteína de <u>Chlorella vulgaris</u>	Proteína de <u>Scenedesmus sp</u>	Proteína de Leche (Vaca)	Proteína de Huevo (Gallina)	Proteína de Maíz
L-Isoleucina	172.14	135.71	168.57	224.64	131.43
L-Leucina	163.33	127.27	159.00	133.94	189.85
L-Lisina	132.76	98.28(***)	134.31	120.34	46.03(*)
AAS	94.00(*)	92.00(**)	133.20	231.60	138.80
AAA	143.50	91.07(*)	160.79	141.11	138.10
L-Treonina	164.71	150.00	130.88	150.59	105.88
L-Triptofano	101.82	136.36	128.18	135.45	63.64(**)
L-Valina	n.r	162.86	165.43	195.71	138.57

n.r no reportado

* Primer Limitante

** Segundo Limitante

*** Tercer Limitante

La composición aminoacídica de Chlorella vulgaris mostró déficit con respecto al Patrón FAO-OMS(1985) solo en comparación con los aminoácidos azufrados(Met + Cys), 6.0%; mucho mejor en comparación con la microalga Scenedesmus sp(Kosaric, 1985), que muestra deficiencia en tres AAE.

Los niveles de L-Lisina en la microalga investigada fueron similares a los del huevo completo y leche. Como está establecido, la L-Lisina es AAE limitante en muchos cereales, como en la proteína del Maíz que lo tiene como Primer Limitante(46.03%).

Por lo tanto, los resultados del presente trabajo justifican el uso de la harina de Chlorella vulgaris como materia prima para la formulación de suplementos alimenticios para animales.

El proceso de elaboración de harina a partir de biomasa de la microalga Chlorella vulgaris se llevó a escala de laboratorio, razón que explica un bajo rendimiento, que implicó realizar repetidamente el procedimiento, para obtener cantidades suficientes para el desarrollo de la investigación.

10. CONCLUSIONES

- ❖ Fue adecuado para la investigación el medio de cultivo empleado, consistente en 10 gramos de triple 15 comercial, diluidos en 100 ml de agua.
- ❖ El mejor medio de cultivo con nutrientes fue utilizado en una relación 1ml de medio de cultivo / un litro de agua destilada, debido a que registro el mayor nivel proteínico.
- ❖ En condiciones de laboratorio el crecimiento optimo de biomasa se obtuvo a los 15 días de cultivo.
- ❖ La harina producida a partir de Chlorella vulgaris presenta un nivel alto en proteína, lo cual vislumbra una buena alternativa como complemento alimenticio en la elaboración de concentrados para animales.
- ❖ La harina de la microalga Chlorella vulgaris puede ser una buena alternativa para su utilización como suplemento en la dieta humana, debido a que presenta un alto contenido de proteína y buen perfil de aminoácidos esenciales.
- ❖ La proteína de Chlorella vulgaris con relación al Patrón de AAE FAO-OMS(1985), muestra como Primer Limitante a los AAS(94.00%), que aparentemente son sus únicos limitantes, ya que fue imposible conocer el valor de L-Valina.

- ❖ La proteína de *Chlorella vulgaris* de acuerdo con la comparación con el Patrón FAO-OMS(1985), presenta menos limitancia Aminoacidica que la proteína del Maíz y la de la microalga *Scenedesmus sp.*

11. RECOMENDACIONES

- ❖ Debido a los buenos niveles de proteína, se sugiere que en futuras investigaciones se establezcan las características de digestibilidad y explorar la posibilidad de utilización como suplemento alimenticio en animales.
- ❖ La harina de la microalga *Chlorella vulgaris* es una buena alternativa para ser utilizada en la dieta humana; y se recomienda para este fin realizar otras determinaciones analíticas: ácidos nucleicos, ácidos grasos.
- ❖ Para la producción de harina de microalga a escala semi-industrial se recomienda utilizar intensidad lumínica de 2000-3000 lux, aireación constante, control permanente del cultivo y separación de la biomasa se debe realizar en una Centrifugadora de Plato. Debido a su alto contenido de humedad, la pasta obtenida, debería presecarse mediante un Evaporador de Película Descendente y concentrarla en un Secador por aspersión, y la pasta seca, molerse en un Molino de Martillo para garantizar el rompimiento total de la pared celular.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalde, J. et al. Microalgas: cultivo y aplicaciones. La Coruña: Servicio de Publicaciones, 1995. p.210.

AOAC. Official Methods of Analysis. 14th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1984.

Bermúdez, E. et al. Spirulina tabletas. Especificaciones de calidad. La Habana: Laboratorio Técnico de Medicamentos, Departamento de Estabilidad, 1991. p.5-10.

Bezares, A. Contenido proteico de cianófitas de aguas residuales. México. Universidad de Colima. 1975.

Castillo, J. Proyecto Peruano-Alemán. Microalgas para consumo humano. Informe Técnico: Estación Planta Piloto Sausal. Universidad de Sucre de Trujillo. Perú. 1978.

De la Torre, M. Aprovechamiento de esquilmos agrícolas y desechos agroindustriales: Prospectiva de la biotecnología en México. Fundación Barrio Sierra, A.C. México, 1985. p. 222-234.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Amino acid content of foods and biological data on proteins. Rome: FAO, 1970 (N. 24).

García, M. et al. Biotecnología Alimentaria, Ed. Limusa, México, 1993. p.383-396.

Horton, H. et al. Bioquímica, Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México. 1993. p.1.4

Kay, R. Microalgae as food and supplement. Rev Food Science Nutritional.Nº30, 1991, p. 55-73.

Kosaric, N. Et al. Growth of Spirulina maxima algae effluents from secondary waste water treatment plants. Biotechnology and Bioengineering.Nº 14.1985. p 881-896.

Lincoln, E. Uso de microalgas en la producción porcina. Universidad de Florida. Gainesville. 1985

Mule, M. Contenido proteico de cianofitas de aguas residuales. México. Universidad de Colima. 1988.

Muller, H y Tobin G. Nutricion y Ciencia de los Alimentos. Ed. Acribia. 1995. p. 96.

Pedraza, G. Cultivo de Spirulina maxima para suplementación proteica. Livestock Research for Rural Development. Vol. 1 Nº 1.1989.

Rajamohan T, Kurup, P. Lysine to arginine ratio of protein and its effect on cholesterol metabolism. Indian J. Biochem Biophys, Nº 23. 1986, p.294-296.

Raymont, J. Plantón y productividad en el océano. Ed. Pergamon Press, 1983.

Robinson, D. Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos. Ed. Acribia. 1991. p. 114- 126.

Roughan, P. Spirulina: a source of dietary Gamma Linoleic Acid. Journal Science Food and Agriculture,Nº 47. 1989. p 85-93.

Scragg, A. Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Ed. Limusa, Noriega Editores.1999. p 192-193

Shubert, B. et al. Nutritional values of Spirulina and Chlorella for human consumption. Annual meeting of the Phycological Society of America. 1985

Uribe, E. Memorias. Cultivo de Microalgas. Memoria: Curso Interamericano de Biología Marina. Universidad Católica del Norte – Organización de Estados Americanos. Chile.1995

ANEXOS

Anexo A. Análisis de Aminoácidos Esenciales.

Determinación de Aminoácidos.

Adjunto a la presente me permito enviarles las condiciones con las que se realizaron los análisis de Aminoácidos esenciales y su Cromatograma.

Condiciones:

Columna: 100 x 4.6 cm

Packing : Hypercarb S

Solvente A : 0.3% TFA en Agua

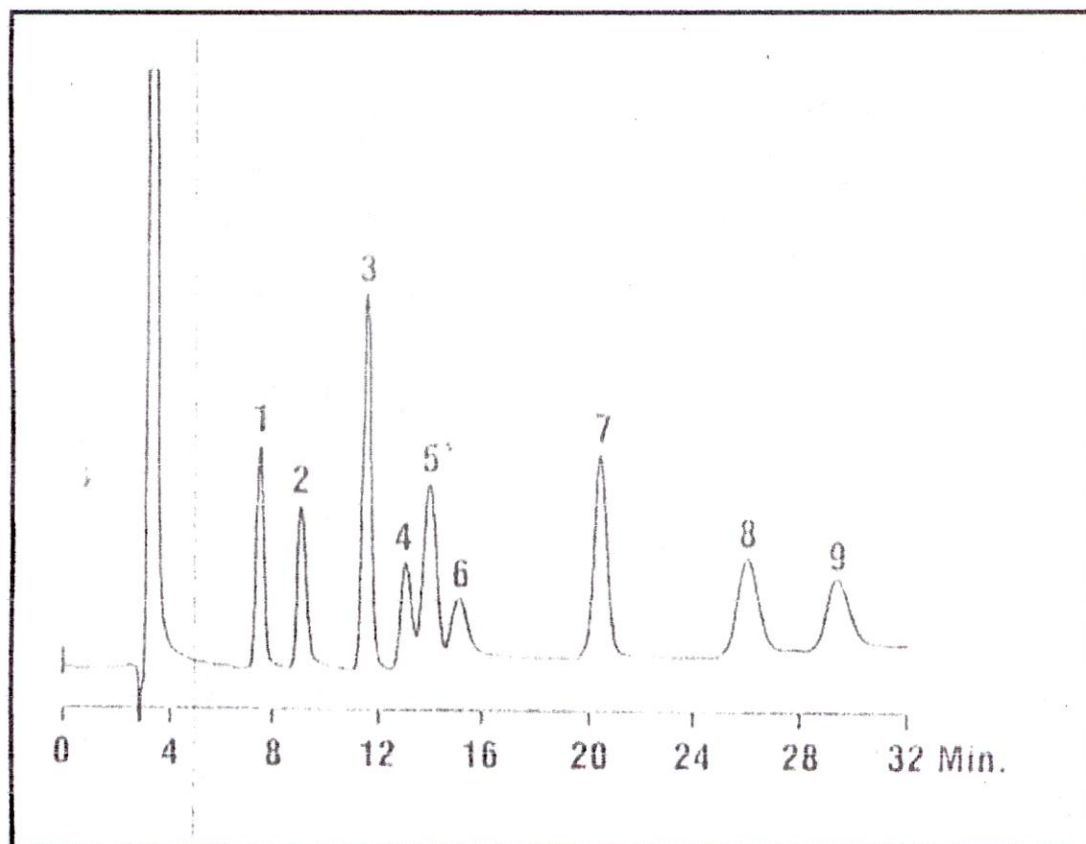
Solvente B . 0.05% TFA en ACN/Agua (90:10)

Gradiente : 0% B a 70% B en 4 minutos

Flujo : 1.2 mL/ min

Detector UV a 225 nm

Cromatograma



Anexo B. Análisis estadístico

Tiempo	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
0	0.100	0.173	0.240
	0.096	0.175	0.238
	0.098	0.162	0.254
2	0.200	0.282	0.325
	0.198	0.285	0.333
	0.208	0.273	0.320
4	0.360	0.448	0.420
	0.361	0.444	0.413
	0.369	0.445	0.433
6	0.642	0.483	0.575
	0.643	0.480	0.578
	0.635	0.492	0.563
8	0.876	0.675	0.680
	0.875	0.678	0.685
	0.883	0.663	0.701
10	1.190	0.875	0.750
	1.195	0.871	0.752
	1.188	0.880	0.736
12	1.450	1.120	0.820
	1.452	1.127	0.828
	1.446	1.125	0.814
14	1.622	1.248	0.942
	1.623	1.241	0.945
	1.615	1.237	0.957
16	1.725	1.323	1.080
	1.720	1.321	1.090
	1.718	1.334	1.082
18	1.808	1.374	1.161
	1.802	1.373	1.168
	1.803	1.381	1.157
20	1.861	1.450	1.225
	1.857	1.454	1.222
	1.862	1.440	1.213

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de Cuadrado	Grados libertad	Promedio de los cuadrado	F CALCULADO	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	21.553	10	2.155328	57529.66	6.12E-126	1.977475961
Concentración	1.8235	2	0.9117655	24336.69	2.21E-95	3.135923521
Interacción	1.8395	20	0.0919750	2454.981	7.316E-87	1.731642385
Dentro de grupo	0.002473	66	3.746E-05			

Total	25.218788	98
-------	-----------	----

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

Ha:

$\mu_1 < \mu_2 < \mu_3$

Decisión = Existen diferencias significativas entre las medias de las Concentraciones, por lo que se Aplica la Prueba Duncan.

MEDIAS

C1/0	C2/0	C3/0	C1/2	C2/2	C3/2	C1/4	C2/4	C3/4	C1/6	C2/6
0,098	0,17	0,244	0,202	0,28	0,326	0,363	0,446	0,422	0,64	0,485
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

C3/6	C1/8	C2/8	C3/8	C1/10	C2/10	C3/10	C1/12	C2/12	C3/12	C1/14
0,572	0,878	0,672	0,689	1,191	0,875	0,746	1,449	1,124	0,821	1,62
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

C2/14	C3/14	C1/16	C2/16	C3/16	C1/18	C2/18	C3/18	C1/20	C2/20	C3/20
1,242	0,948	1,721	1,326	1,084	1,804	1,376	1,162	1,86	1,448	1,22
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33

Data File : Keyboard Function : **RANGE**

Error Mean Square = 3.700e-005

Error Degrees of Freedom = 66

No. of observations to calculate a mean = 3

Duncan's Multiple Range Test

LSD value = 0.009916

$s_{\bar{x}} = 0.003512$ at $\alpha = 0.050$

x

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.1000	Mean	31 =	1.860 A
Mean	2 =	0.1700	Mean	28 =	1.810 B
Mean	3 =	0.2500	Mean	25 =	1.730 C
Mean	4 =	0.2100	Mean	22 =	1.620 D
Mean	5 =	0.2800	Mean	19 =	1.450 E
Mean	6 =	0.3300	Mean	32 =	1.450 E
Mean	7 =	0.3700	Mean	29 =	1.380 F
Mean	8 =	0.4500	Mean	26 =	1.330 G
Mean	9 =	0.4300	Mean	23 =	1.250 H
Mean	10 =	0.6700	Mean	33 =	1.220 I
Mean	11 =	0.4900	Mean	16 =	1.200 J
Mean	12 =	0.5800	Mean	30 =	1.170 K
Mean	13 =	0.8800	Mean	20 =	1.130 L
Mean	14 =	0.6800	Mean	27 =	1.090 M
Mean	15 =	0.6900	Mean	24 =	0.9500 N
Mean	16 =	1.200	Mean	13 =	0.8800 O
Mean	17 =	0.8800	Mean	17 =	0.8800 O
Mean	18 =	0.7500	Mean	21 =	0.8300 P
Mean	19 =	1.450	Mean	18 =	0.7500 Q
Mean	20 =	1.130	Mean	15 =	0.6900 R
Mean	21 =	0.8300	Mean	14 =	0.6800 S
Mean	22 =	1.620	Mean	10 =	0.6700 T
Mean	23 =	1.250	Mean	12 =	0.5800 U
Mean	24 =	0.9500	Mean	11 =	0.4900 V
Mean	25 =	1.730	Mean	8 =	0.4500 W
Mean	26 =	1.330	Mean	9 =	0.4300 X
Mean	27 =	1.090	Mean	7 =	0.3700 Y
Mean	28 =	1.810	Mean	6 =	0.3300 Z
Mean	29 =	1.380	Mean	5 =	0.2800 [
Mean	30 =	1.170	Mean	3 =	0.2500 \
Mean	31 =	1.860	Mean	4 =	0.2100]
Mean	32 =	1.450	Mean	2 =	0.1700 ^
Mean	33 =	1.220	Mean	1 =	0.1000 _